






REAGENT FOR DIAGNOSIS OF ACTIVE TUBERCULOSIS, ITS REAGENT KIT AND DETECTION OF ACTIVE TUBERCULOSIS

Patent number: JP11263736
Publication date: 1999-09-28
Inventor: NAKAMURA REIKO
Applicant: JAPAN BCG SEIZO KK
Classification:
- international: A61K9/70; A61K9/70; (IPC1-7): A61K49/00; A61K39/04
- european: A61K9/70E
Application number: JP19990029024 19990205
Priority number(s): US19980073911P 19980206; US19980096140P 19980811

Also published as:

 WO9939693 (A3)
 WO9939693 (A2)
 EP1061905 (A3)
 EP1061905 (A2)
 CN1679928 (A)

more >>

Report a data error here

Abstract of JP11263736

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject reagent readily penetrating skin and having compatibility with the skin of a test specimen by mixing a purified protein of the same kind as the protein produced by *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* during propagation, and not produced by other acid-fast bacteria, with a nonionic surfactant in a specific proportion in a diluent.
SOLUTION: The objective reagent is obtained by mixing 1-100 pts.wt. purified protein (preferably MPB64) of the same kind as the protein produced by *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*, and not produced by almost other acid-fast bacteria in the whole acid-fast bacteria capable of infecting and attacking a human being, with a trace of nonionic surfactant in 100 pts.wt. diluent. The objective reagent preferably comprises the first reagent of one of the before reagent, and the second reagent obtained by mixing 1-75 pts.wt. purified protein of the same kind as the protein not produced by the *Mycobacterium tuberculosis* but produced by the *Mycobacterium bovis* during propagation, with a trace amount of nonionic surfactant in 100 pts.wt. diluent.

Data supplied from the [esp@canet](http://www.who.int/csr/don) database - Worldwide

13

일본공개특허공보 제11-263736호

(10) 日本国特許庁 (J.P.)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-263736

(43) 公開日 平成11年(1999)9月28日

(51) Int. Cl.⁴A 61 K 49/00
30/04

識別番号

F I

A 61 K 49/00
30/04

D

審査請求 未請求 請求項の数12 O L (全 13 P)

(21) 出願番号 特開平11-22024

(22) 出願日 平成11年(1999)2月5日

(31) 優先権主張番号 60/073811

(32) 優先日 1996年2月5日

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(31) 優先権主張番号 60/098140

(32) 優先日 1996年8月11日

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 55319309

日本ビクター・コーポレーション株式会社
東京都文京区小目内4-2-6

(72) 発明者 中村幸子

東京都武蔵野市中野2-25-3

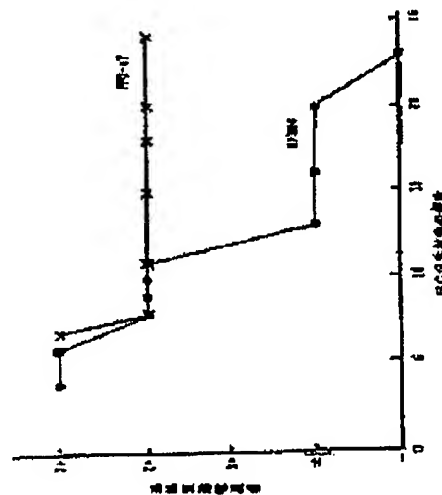
(74) 代理人 弁護士 山田 正国

(54) 【発明の名称】 活動性結核診断用抗原その検査キット及び活動性結核検出方法

(57) 【要約】

【課題】活動性結核に感染している被検体を、BCG陽性した者や活動性結核から回復したものから区別する試薬、試薬キット、及びこれらを使用する検査法乃至診断法を提供する。

【解決手段】希釈液100部に対し重量比で1乃至75部混合し、これに極少量のツィーン80を混合したものを試薬とする。地方精水性バットを備えたパッチバンドの用液とする。試薬を精水性バットに50μl乃至200μl含浸させて、これを被検体の皮膚に張り1日乃至3日後に剥がし、皮膚の紅赤の有無により活動性結核に感染しているか否かを判断する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】人に感染し発病させる全ての抗酸菌のうち、結核菌と非結核菌が増殖中に産生し、残りの殆どの抗酸菌が産生しない蛋白質と同様の精製蛋白質に、前記精製蛋白質が稀釈液 100 部中に 1 乃至 100 部重量比の割合で、極少量の非イオン界面活性剤と共に混合してあることを特徴とする活動性結核診断用試薬。

【請求項 2】前記精製蛋白質は MPB 654 であることを特徴とする請求項 1 記載の活動性結核診断用試薬。

【請求項 3】前記請求項 1、2 記載のうちのひとつの試薬を第 1 試薬とし、これと人に感染し発病させる全ての抗酸菌のうち、前記結核菌は産生せず、前記非結核菌が増殖中に産生する蛋白質と同様の精製蛋白質に、前記精製蛋白質が稀釈液 100 部中に 1 乃至 75 部重量比の割合で、極少量の非イオン界面活性剤と共に混合してある第 2 試薬よりなり、前記第 1 試薬と第 2 試薬との組合せよりなる請求項 1 又は 2 記載の活動性結核診断用試薬。

【請求項 4】前記第 2 試薬の精製蛋白質は MPB 7A7 であることを特徴とする請求項 3 記載の活動性結核診断用試薬。

【請求項 5】前記第 1 試薬と第 2 試薬と人に感染し発病させる全ての抗酸菌が増殖中に産生する蛋白質と同様の精製蛋白質に、前記精製蛋白質が稀釈液 100 部中に 1 乃至 75 部重量比の割合で、極少量の非イオン界面活性剤と共に混合してある第 3 試薬よりなり、前記第 1 試薬、第 2 試薬及び第 3 試薬との組合せよりなることを特徴とする請求項 1、2、3 又は 4 記載の活動性結核診断用試薬。

【請求項 6】前記第 3 試薬の精製蛋白質は MPB 59 であることを特徴とする請求項 5 記載の活動性結核診断用試薬。

【請求項 7】前記非イオン界面活性剤は Tween 80 であり、その含有量は前記試薬に対し 0.1 乃至 0.002% であることを特徴とする請求項 1、2、3、4、5 又は 6 記載の活動性結核診断用試薬。

【請求項 8】試薬とパッチバンドとよりなり、試薬は前記請求項 1、2 又は 7 記載のうちのひとつの試薬であり、前記パッチバンドはその内面に綿布、織布、不織布、合成樹脂製のスポンジなどよりなる直径乃至 1 辺が 7mm 乃至 15mm である親水性パットを備え、前記パッチバンド、親水性パットの背面のうちの少なくとも一方は疎水性としてあるものであることを特徴とする活動性結核診断用試薬キット。

【請求項 9】請求項 8、4 または 7 記載の前記第 1 試薬と第 2 試薬、請求項 5、6 又は 7 記載の第 1 乃至第 3 試薬のうちの 1 つの前記試薬キットとパッチバンドとよりなり、前記パッチバンドはその内面に綿布、織布、不織布合成樹脂製のスポンジの 1 種よりなる直径乃至 1 辺が 7mm 乃至 15mm である親水性パットを備え、前記パッチバンド、親水性パットの背面のうちの少なくとも

一方は疎水性としてあるものであることを特徴とする活動性結核診断用試薬キット。

【請求項 10】請求項 1、2、7 記載のうちのひとつの試薬とパッチバンドを用い、前記パッチバンドまたはその内面に綿布、織布、不織布、合成樹脂製のスポンジなどよりなる直径乃至 1 辺が 7mm 乃至 15mm である親水性パットを備え、前記パッチバンド、親水性パットの背面のうちの少なくとも一方は疎水性としてあり、その親水性パットに前記請求項 1 又は 2 記載の試薬を 50 μ L 乃至 200 μ L 含浸させ、前記パッチバンドを被検体の皮膚に 1 日乃至 7 日間貼り付けて固定し、その後剥離して皮膚の遅延型過敏反応の有無を判定することを特徴とする活動性結核検査方法。

【請求項 11】前記請求項 10 の方法において、試薬として請求項 1、2 記載の試薬に代え請求項 3、4、7 のうちのひとつの試薬を用い、第 1 試薬と第 2 試薬をそれぞれ別のパッチバンドの前記親水性パットに含浸させ、これら前記パッチバンドをそれぞれ同時に被検体の皮膚に 1 日乃至 7 日間貼り付けて固定し、その後剥離してそれぞれのパッチバンドの皮膚の遅延型過敏反応の有無を判定することを特徴とする請求項 10 記載の活動性結核検査方法。

【請求項 12】前記請求項 10 の方法において、試薬として請求項 1、2 記載の試薬に代え請求項 5、6、7 のうちのひとつの試薬を用い、第 1 試薬と第 2 試薬と第 3 試薬をそれぞれ別のパッチバンドの前記親水性パットに含浸させ、これら前記パッチバンドをそれぞれ同時に被検体の皮膚に 1 日乃至 7 日間貼り付けて固定し、その後剥離してそれぞれのパッチバンドの皮膚の遅延型過敏反応の有無を判定することを特徴とする請求項 10 記載の活動性結核検査方法。

【0001】
【発明の属する技術分野】この発明は活動性（感染性）結核の診断、試薬キット及びその活動性結核菌の検出乃至診断方法に関する。特にこの発明は抗酸菌抗原を含むパッチからなり、活動性結核の検出と診断に充分な免疫応答を創設する前記パッチの応用に関する。

【0002】
【従来の技術】人間の感染症は古代からたびたびあり、結核は 2500 年以前より古くから主な死亡原因であった。抗酸菌は全てでも限られた免疫を誘起しない個々においては、主な病原体又は死亡の原因であり、免疫力の弱まった患者では極めて強力な伝染力を持っている。97 種を超える抗酸菌が発見されているけれども、人に感染するものの 5% 以上は百種の種によって引き起こされる。即ち、結核菌 (*M. tuberculosis*)、*M. アビウム*-*イントラセルラーレ* (*M. avium-Intracellulare*)、*M. カンザシー* (*M. kansasii*)、*M. フォルチユータム* (*M. fortuitum*)、*M. ケロネー* (*M. chelonae*)

nae)、らい菌(*M. leprae*)である。

【0003】人にとって最も一般的な抗酸菌は結核菌、牛型結核菌(*M. bovis*)、*M. africanum*によって引き起こされる結核(*TB*)である(メルクマニュアル1992)。典型的な感染は、末梢の組織に到達可能な感染因子を吸い込むことから始まる。結いて肺動脈のマクロファージに取り込まれた菌は自由に増殖でき、その結果細胞を破壊する。破壊は感染箇所への変化するマクロファージや白血球が集積する原因となり、そこで最終的に破壊が起きる、というカスケード(過剰反応)作用を確立する。

【0004】病変は肺動脈リンパ管や血流そして骨髄、脾臓、腎臓、骨そして中枢神経系などの他の組織にまで移動する感染したマクロファージによって初期段階で更に広まる(マレー、他、*メディカル マイクロバイオロジー*、[Murray et. al. Medical Microbiology])。

【0005】WHOは免疫拡大計画(EPI)や重症度低下早期治療(DOTS)のような計画を提案して、結核との戦いを推進している。結核撲滅のためには、診断、治療そして予防が同じくらい重要である。活動性の結核患者を早く発見できれば、早期治療につながり、それによっておよそ90%の治療が期待できる。それゆえ、早期診断が結核との戦いには不可欠である。

【0006】結核は有史以来ほとんどの人間人類にとって主要な病気であり続けた。病気の発生は少なくとも19世紀中期から生活水準の向上に伴って下降してきた。しかしながら、世界中の多くの保健機関の努力にもかかわらず、結核の撲滅は達成されなかった。それどころか、撲滅は現在の課題である。世界人口の3分の1近くが結核菌に感染しており、年間約800万人が罹患し、約300万人が結核が原因で死亡している。

【0007】数十年間下降傾向が続いた後、結核は又増えている。米国では、1,000万人が感染していると見られている。1990年には、新しい感染例として28,000件近い数字が報告されているが、これは1989年の2.4%増である。1985年から1990年の間、16%の増加が見られた。

【0008】結核は活動性の感染者が細菌を含む“核滴”を咳、痰もしくは尿によって、空気中に撒き散らしたとき、これら核滴を含む空気を第三者が吸い込み、経気道的に結核菌が体内に取り込まれる。従って、人口過密な生活環境や空間の共有が特に結核の蔓延の原因になっており、米国で観察された刑務所の囚人や大都市におけるホームレスにみられる結核感染の根拠をなしている。

【0009】一時は減少傾向にあると思われていた結核感染が肺病への深刻な脅威として又復活してきた。人が密集している地域や標準以下の住宅環境に住む人は、結核に感染している人がますます多くなっていることがわ

かっている。免疫力の弱っている人は抗酸菌に感染し、それが原因で死亡する危険が高い。人ごみの多いところ、例えば刑務所やスラム街は人から人へ感染しやすい場所である。死別に対し抵抗力のある結核菌の出現で感染率に対する治療が一層難しくなった。世界的にみれば抗酸菌に感染している人の多くは貧しい人が、医療施設が不完全な地域に住む人々である。そうした人々は結核菌感染の検査を受けるのは容易ではないし感染を発見するために安価で皮膚を損傷しない方法が必要である。さらに、肺結核やホームレスの人々は医療設備が不完全で肉体的にも病んでいるのが普通であるので、そうした人々に拘わる結核対策は成功していない。

【0010】抗結核薬として最も効果のあるもののうち、少なくとも2つの薬剤であるリファンピシン(RFP)とイソニアジド(INH)に対し抵抗力を持つ結核の発生が病院の施設から報告され、HIV感染者への感染も報告されている。米国ではエイズ(AIDS)患者のうち、約半数が抗酸菌に感染し、特に重い合併症になっている。その結果感染すると致命的な感染症に発展するものがしばしばである。

【0011】薬剤耐性結核菌(MDR-*M. tuberculosis*)の出現で極めて状況が悪化している。少なくとも一種の従来の薬剤に抵抗力のある新しい結核菌の率は1980年代前半の10%から1991年には23%に増えている。現在は、すべて結核菌の7%が少なくとも一種の薬剤に抵抗力があり、これは1980年代前半の数の2倍を超えている。さらに結核以外の抗酸菌もAIDS患者を苦しめる日和見感染症の原因としてますます問題となっている。MAC(マイコバクテリウム・アビウム-イントラセルラーレコンプレックス *Mycobacterium avium-intracellulare complex*)からの菌、とくに血清型4と8は、AIDS患者からのマイコバクテリア分離の68%を占めている。AIDS患者からは極めて多数のMACがみつかり(組織グラム当たり10¹⁰菌数)、その結果感染したAIDS患者の予後は悪い。

【0012】マイコバクテリウム・アビウム菌(*Mycobacterium avium*)を含む抗酸菌はマクロファージのような宿主の中で生育できる細胞内寄生菌である。抗酸菌の生育は遅くエンドキシンを産生せず、そして非運動性である。マイコバクテリウム・アビウム菌はマクロファージ内で増殖し、マクロファージを殺し、また新たなマクロファージに取り込まれ、再びこの過程を繰り返す。

【0013】宿主の抵抗力はマクロファージの活性に依存する。活性化したマクロファージは細胞内に潜るバクテリアを殺すことができる。この活性は抗酸菌の蛋白に対する細胞性免疫反応の結果として産生された特異的T細胞に影響される。

【0014】抗酸菌による感染はマクロファージ内での抗酸菌の生存能力と効果的なマクロファージを活性化する宿主の能力との間にある微妙なバランスにある消滅戦

に初えられて来た。迅速に開始する抗感染物質があるときは治療の進展は宿主に殊方するように傾く。

【0015】抗酸菌の毒性に関する英因については、はっきりしたことが判っていない。コロニーの形態や毒性に関するものとして多くの研究者が細胞壁やバクテリア表面の脂質を挙げている。研究結果によればある種の抗酸菌細胞の表面による α -ミコサイド (α -mycosides) がマクロファージ内で菌の生存を促進するのに重要であると示している。コードファクターであるトレハロース、 α -ジミコレート (Trehalose, α -dimycolate) は他の抗酸菌に見られた。

【0016】ミコバクテリウム・アビウム菌は、いくつかの区別できるコロニー形態をつくる。通常の実験室用の培地で透明で白いコロニーとして生育する菌は組織培養中のマクロファージ内で増殖し、感受性マウスに接種すると毒性を示し、抗生物質に抵抗力を示す。実験室の培地で獲得された粗く透明なコロニーを作る菌が野生型のくすみを帯びたコロニー形態を生じたときはしばしばマクロファージ内で生育できず、マウスに対して非毒性となり、抗生物質に対して非常に感受性となる。

【0017】ミコバクテリウム・アビウム菌の透明で白いコロニーを作る株と不透明なコロニーを作る株とのコロニー形態の違いは、炭水化物代謝能力と作用する透明で白い菌の表面を覆っている細胞質のためである。このカプセルまたは被覆物は明らかに、リゾソーム酵素や抗生物質から有毒ミコバクテリウム・アビウム菌を守る α -ミコサイドから主に構成されている。対照的に無毒性の不透明なミコバクテリウム・アビウム菌の形態は表面に殆ど α -ミコサイドが存在しない。抗生物質やマクロファージに殺されることに対する抵抗力は、両方ともミコバクテリウム・アビウム菌の表面にある糖衣物質によるものである。

【0018】結核診断は病原菌の分離と同意で確認されるが簡便な診断は咳痰塗抹、胸部X線検査や臨床的症状を基とする。

【0019】培地上での抗酸菌の分離は4乃至8週間かかる。種の同定はさらに2週間を要する。迅速に抗酸菌を検査する方法は他にも幾つかある。例えばポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase chain reaction (PCR))、MTD (Mycobacterium tuberculosis direct test)、放射線ラベルを使う試験方法などがあるが、これらの方法は材料や機械器具に多額の費用がかかる。広範囲に使用されている診断方法のひとつはツベルクリン皮膚試験である。種々の皮膚試験があるけれども、特に2つのツベルクリン抗原が使われている。つまり旧ツベルクリンと精製ツベルクリン (PPD) である。抗原を皮膚内に注射するか、抗原を局所に貼り付けて、針刺器具を使って皮膚内に経皮的に入れるタインテストの方法がある。

【0020】これら皮膚試験の診断法にはいくつかの弱

点がある。例えば前記タインテストは皮膚内の局所へ注入される抗原を正確にコントロールできないので、敏感と認められない (マレー他、メディカル ミクロバイオロジー、C. V. モビス・カンパニー [Murray et al. Medical Microbiology The C. V. Mosby Company] 219-230 (1990) 参照)。

【0021】ツベルクリン皮膚試験は通常大変早くかつ正確に結核感染を見つけれられるが、しばしば誤診となる。つまり陽性の結果には活動性結核患者のみならず、BCG接種を受けた人や、結核菌に感染はしたが完成しなかった人々もふくまれるからである。そのゆえにツベルクリン皮膚試験によって活動性結核患者を他の陽性反応の人から区別することは難しい。更にツベルクリン皮膚試験は結核以外の抗酸菌 (mycobacteria other than TB = MOTT) に感染した人と交叉反応を起こす。よって、現在利用できる皮膚試験を用いた診断はしばしば誤りや、不正確さの原因となる。

【0022】必要なのは、活動性結核の人と、抗酸菌に感染したが活動性の病状ではない人、あるいはBCG接種を受けた事のある人のような免疫的に影響を受けている人と区別する安価な方法である。さらに、活動性結核とその治療の進捗または以前罹患したことを区別できる試験のような、抗酸菌に感染した人に対してする薬物療法の効果を確認する方法がない。更に、必要なのは子供に簡単に適用できる試験方法である、というの1次注射や接種器具を含めて現在使われて皮膚試験には子供が特に恐怖を感じているからである。被接種者の皮膚表面を傷つける方法でない試験法は、保健従事者が被接種者の体液に接触することを最小限にし、被接種者中に存在するかもしれない伝染性病原の感染を少なくする。ホームレスや刑務所の結核患者を検査するとき、簡便に試験でき、結果が陽性が陰性が簡便に決定できる試験方法が肝要である。

【0023】先頭たる特開平8-34209号には東京BCG東京株と培養した培養液の培地に含まれるMPB64とMPB70をそれぞれ分離精製し、これらをそれぞれ鶏卵の軟白に混合し、BCG接種したモルモットと結核に感染したモルモットの双方の皮膚に塗布して実験したところBCG接種によるツベルクリン陽性したモルモットは共に陽性の反応を示し、結核菌に感染したものはMPB64に対しては陽性であるがMPB70に対しては陰性であった旨が記載されている。更に本件発明者は実験を重ねたところ、MPB64の皮膚塗布テストはBCG接種によるツベルクリン陽性したモルモットにおいて、初回の凡そ13週までは陽性を示すが、その後においては、陰陽性から陰性を示し変化し、23週を過ぎればMPB64が陰性になることを知見した。

【0024】MPB64は結核菌 (*M. tuberculosis*) 群に特有な抗酸菌抗原である。最初にハーボエ (Harboe) など (Infect. Immun. 1985) によってMPT6

4として述べられていたが、その後のいろいろの研究で研究されわけてきた。“MPB64”と“MPT64”は同じ抗原である。MPT64は結核菌(*M. tuberculosis*)の培養液から分離したもので、ヒト型結核菌の抗酸菌蛋白(mycoacterial protein of tuberculosis)と名づけられた。MPB64はその牛型結核菌(*M. bovis*)またはBCG株(*Mycobacterium bovis* BCG)から分離されるものである。この蛋白はバクテリアの生育中に分泌され、モルモット、人及び牛で遅延型過敏症(DTH)を引き起こす。またMPB70はM.ボビスは産生するが、結核菌及びM.アビウム、イントラセラーレは産生しないことが既に知られている。また、M

PB59は、すべての抗酸菌が産生すること及びMPB44及びMPB63については、出願人会社内で非公開で実験したところ結核菌が産生することを発見した。またこれらMPB64、MPB70、MPB59、は前述したように、それぞれ少なくとも抗酸菌の一種から産生するものであるが、他の抗酸菌以外の菌種が産生すると言う論文などの報告は本件発明者及び出願人会社が調査した範囲では全く開いていない。また、前記本件出願人が開発したMPB64が活動性結核の動物に対して遅延型過敏症を産生することに著目し、又MPB70は前記遅延型過敏症を産生しないことに著目し、活動性結核の検出、及び活動性結核以外の非結核抗酸菌感染かどうかの判断が可能となることを発見した。抗酸菌の種類と産生する蛋白質の一列を示せば表1の通りである。

【0025】

【表1】抗酸菌種と分泌蛋白一覧表

	MPB64	MPB70	MPB59
結核菌	+	+	+
M. <i>avium</i> H37Rv	+	+	+
M. <i>canis</i>	+	+	+
M. <i>fortuitum</i>	+	+	+
M. <i>gordonii</i>	+	+	+
M. <i>hagermanii</i>	+	+	+
M. <i>neoaurum</i>	+	+	+
M. <i>paratuberculosis</i>	+	+	+
M. <i>scrofa</i>	+	+	+

【0026】

【発明が解決しようとする課題】発明の目的は、活動性結核を検出するための鋭敏な試薬、並びに検査乃至診断方法を提供することである。もうひとつの目的は、皮膚に局所注射を行う方法によって活動性結核を検出するための鋭敏な試薬、並びに検査乃至診断方法を提供することである。もうひとつの目的は、結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)によって引き起こされる活動性の病気を検出するための鋭敏な試薬、並びに検査乃至診断方法を提供することである。もうひとつの目的は、牛型結核菌(*Mycobacterium bovis*)によって引き起こされる活動性の病気を検出するための鋭敏な試薬、並びに検査乃至診断方法を提供することである。もうひとつの目的は、抗酸菌によって引き起こされる活動性の病気を検出するための鋭敏な試薬、並びに検査乃至診断方法を提供することである。もうひとつの目的は、胸部に貼付した抗原がMPB64であり、抗酸菌によって引き起こされる活動性の病気を免疫学的な方法により検出するための鋭敏な試薬、並びに検査乃至診断方法を提供することである。もうひとつの目的は、試験法が新しい鋭敏な試

薬、並びに検査乃至診断方法を提供することである。もうひとつの目的は、治療効果を監視するための活動性結核検出の鋭敏な試薬、並びに検査乃至診断方法を提供することである。もうひとつの目的は、結核菌(*M. tuberculosis*)のような抗酸菌によって引き起こされる活動性の病気の診断と検出のための鋭敏な試薬の組み合わせ、並びに検査乃至診断方法を提供することである。もうひとつの目的は、家庭内の接触による抗酸菌によって引き起こされる活動性の病気を検出するための鋭敏な試薬、並びに検査乃至診断方法を提供することである。もうひとつの目的は、化学療法後の結核患者の臨床状態を監視するための鋭敏な試薬、並びに検査乃至診断方法を提供することである。もうひとつの目的は、活動性結核にかかっている子供達のための鋭敏な試薬、並びに検査乃至診断方法を提供することである。もうひとつの目的は、人間の結核のみならず、牛の活動性結核の診断にも適応させる試薬及び診断方法を提供することである。

【0027】

【課題を解決する手段】前記課題を達成するためにこの発明は人に感染し病気をさせる全ての抗酸菌のうち、結核菌

と他の抗原となる牛型結核菌が増殖中に産生し、熱りの殆どの抗原が産生しない蛋白質と同様の特異蛋白質に、前記特異蛋白質が稀釈液 100 部中に 1 乃至 75 部重量比の割合で、極少量の非イオン界面活性剤と共に混合してあることを特徴とする活動性結核診断用試薬とする。また前記課題を達成する為にこの発明の活動性結核診断用試薬の前記特異蛋白質は MPB 64 であることを特徴とすることが好ましい。

【0028】また前記課題を達成する為にこの発明の活動性結核診断用試薬の前記請求項 1、2 のうちのひとつの試薬を第 1 試薬とし、これと人に感染し発病させる全ての抗原のうち、前記抗原は産生せず、前記請求項 1 記載の牛型結核菌が増殖中に産生する蛋白質と同様の特異蛋白質に、前記特異蛋白質が稀釈液 100 部中に 1 乃至 100 部重量比の割合で、極少量の非イオン界面活性剤と共に混合してあることを特徴とする活動性結核診断用試薬を第 2 試薬とし、前記第 1 試薬と第 2 試薬との組合せよりなる活動性結核診断用試薬とする。前記第 2 試薬の特異蛋白質は MPB 70 であることを特徴とすることが好ましい。

【0029】また前記課題を達成する為にこの発明の活動性結核診断用試薬の前記第 1 試薬と第 2 試薬と人に感染し発病させる全ての抗原が増殖中に産生する蛋白質と同様の特異蛋白質に、前記特異蛋白質が稀釈液 100 部中に 1 乃至 75 部重量比の割合で、極少量の非イオン界面活性剤と共に混合してあることを特徴とする活動性結核診断用試薬を第 3 試薬とし、前記第 1 試薬、第 2 試薬及び第 3 試薬との組合せよりなる活動性結核診断用試薬とする。また前記課題を達成する為にこの発明の活動性結核診断用試薬の前記第 3 試薬の特異蛋白質は MPB 59 であることを特徴とすることが好ましい。

【0030】また前記課題を達成する為にこの発明の請求項 1、2、3、4、5 又は 6 記載の活動性結核診断用試薬の前記非イオン界面活性剤は Tween 80 であり、その含有量は前記試薬に対し 0.1 乃至 0.002 % であることを特徴とすることが好ましい。

【0031】また前記課題を達成する為にこの発明は試薬とパッチバンドとよりなり、請求項 1、2 又は 7 記載のうちのひとつの活動性結核診断用試薬とパッチバンドとよりなり、試薬は前記請求項 1、2 又は 7 記載のうちのひとつの試薬であり、前記パッチバンドはその内面に織布、綿布、不織布、合成樹脂製スポンジなどよりなる直径乃至 1 辺が 7 mm 乃至 15 mm である親水性パッチバンドを備え、前記パッチバンド、親水性パッチバンドの背面のうちの少なくとも一方は疎水性としてあるものであることを特徴とする活動性結核診断用試薬キットとする。

【0032】また前記課題を達成する為にこの発明は前記第 1 試薬と第 2 試薬、第 1 乃至第 3 試薬のうちの 1 つの前記試薬キットとパッチバンドとよりなり、前記パッチバンドはその内面に織布、綿布、不織布、合成樹脂製

のスポンジの 1 種よりなる直径乃至 1 辺が 7 mm 乃至 15 mm である親水性パッチバンドを備え、前記パッチバンド、親水性パッチバンドの背面のうちの少なくとも一方は疎水性としてあるものであることを特徴とする活動性結核診断用試薬キットとする。

【0033】また前記課題を達成する為にこの方法発明は請求項 1、2、7 記載のうちのひとつの試薬とパッチバンドを用い、前記パッチバンドまたはその内面に織布、綿布、不織布、合成樹脂製スポンジなどよりなる直径乃至 1 辺が 7 mm 乃至 15 mm である親水性パッチバンドを備え、前記パッチバンド、親水性パッチバンドの背面のうちの少なくとも一方は疎水性としてあり、その親水性パッチバンドに前記請求項 1 又は 2 記載の試薬を 50 μ L 乃至 200 μ L 含浸させ、前記パッチバンドを被検体の皮膚に 1 日乃至 7 日間貼り付けて固定し、その後剥離して皮膚の遅延型過敏反応の有無を判定することを特徴とする活動性結核反応検出方法とする。

【0034】また前記課題を達成する為にこの方法発明は前記請求項 10 の方法において、試薬として請求項 1、2 記載の試薬に代え請求項 3、4、7 のうちの試薬の組合せよりなる一種のキットを用い、第 1 試薬と第 2 試薬をそれぞれ別のパッチバンドの前記親水性パッチに含浸させ、これら前記パッチバンドをそれぞれ同時乃至逐時的に皮膚に 1 日乃至 7 日間貼り付けて固定し、その後剥離してそれぞれのパッチバンドの皮膚の遅延型過敏反応の有無を判定することを特徴とする。

【0035】また前記課題を達成する為にこの方法発明は前記請求項 10 の方法において、試薬として請求項 1、2 記載の試薬に代え請求項 3、5、7 または請求項 9 記載のうちの一種のキットを用い、第 1 試薬と第 2 試薬と第 3 試薬をそれぞれ別のパッチバンドの前記親水性パッチに含浸させ、これら前記パッチバンドをそれぞれ同時乃至逐時的に皮膚に 1 日乃至 7 日間貼り付けて固定し、その後剥離してそれぞれのパッチバンドの皮膚の遅延型過敏反応の有無を判定することを特徴とする。

【0036】発明の作用
前記請求項 1、2 または 7 記載の発明を用いる方法及び請求項 9 記載の試薬とパッチバンドからなるキットを用い、請求項 10 記載の検出方法を説明する。まず、被検体（人、牛など）の皮膚の一部、人間の場合は前腕の一部の箇所をアルコールなどの消毒剤で消毒にし、請求項 1、2 乃至 7 の試薬を用い、若しくは請求項 9 のキットのうちの試薬を用い、この試薬 50 μ L（マイクロリットル）乃至 200 μ L を前記パッチバンドの親水性のパッチに含浸させ、この含浸液を前記箇所にもつけしがり皮膚に固定する。

【0037】このようにすると、前記皮膚と試薬は密着し、その貼付位置は移動せず試薬中に含まれる Tween 80 で代表される非イオン界面活性剤の作用により、皮膚は試薬を浸水することなく完全に密着し、時間の経過

と共に皮膚内に浸透する。前記親水バットの外側は、疎水性の親水バンドで覆われているから、試薬が、これらの層を通して、外部に発散するのを制限し、有効に皮膚に経皮的に供給する。パッチバンドを貼付後1日乃至7日、好ましくは1日乃至5日後、通常3日後にパッチバンドを被験体の皮膚より剥離する。この結果、活動性結核が発症している被験体においては、その部分の皮膚が遅延型過敏反応により、発赤、腫脹、赤い小斑点が見られ、そうでないものは反応がない。但し、モルモットにおいてはB CG接種後、10週に満たないものは、同様な反応がみられたが、13週を過ぎる頃より陰性となり23週以後は全く陰性となった。

【0008】また、請求項3、4または7記載の試薬、他記請求項9の試薬とパッチバンドキットを用い請求項11記載の方法を説明する。前述の請求項10同様、各試薬毎に別のパッチバンドを用い、前記と同様の量の試薬を含ませ同様に皮膚に貼る。このとき異なる試薬のパッチバンドは同時に貼り付けても、或いは別々の時、即ち経時的に貼り付けてもこの説明としては同じである。即ち、一方のパッチテスト後、1時間後乃至数週間後であっても、この説明としては同じである。

【0009】また、請求項5、6または7記載の複数の試薬の他、前記請求項10の試薬とパッチバンドキットを用い請求項12記載の方法を説明する。前述の請求項10同様、各三種の試薬毎に別のパッチバンドを用い、前記と同様の量の試薬を含ませ同様に皮膚に貼る。このとき異なる試薬のパッチバンドは同時に貼り付けても、或いは別々の時、即ち経時的に貼り付けてもこの説明としては同じである。即ち、一方のパッチテスト後、1時間後乃至数週間後に他のパッチテストを行っても、この説明としては同じである。

【0040】

【発明の実施の形態】実施形態1

請求項1、2乃至請求項7記載の発明を含む試薬である。MPB64蛋白としては人型結核菌、牛型結核菌若しくはB CG東京株、B CGロシア株、B CGスエーデン株、B CGモロー株（ブラジル）（これらは一般に結核菌コンプレックスと総称されている）のうちの一種のB CG株から分離したMPB64蛋白をそれぞれ精製したものを用いる。要するに、少なくともをMPB64を産生するB CG株であればどれでもよい。前記のB CG東京株はその他MPB45、MPB31、MPB59、MPB70及びMPB69を産生するので、これより一括分離精製でき、作業性がよい。しかし結核菌、牛型結核菌、その他の抗酸菌からの製法も可能であるが、これら抗酸菌からの製法は従来の危険性があるので認められない。またこれらの菌株のうちよりMPB64他MPB70、MPB59、MPB45又は／及びMPB69などを産生する遺伝子を増出し、他の病原性の低い菌株であった増殖の旺盛な菌に遺伝子組み換えにより組み込まれた

菌株を作り、これを培養し、この菌株より産生するMPB64などの蛋白質を用いても、この出願の発明の範囲である。このMPB64その他の前記蛋白質を稀釈液に混合する。稀釈液としてはリン酸緩衝液、生理的食塩水の一様を用いるが、一般にはリン酸緩衝液が好ましい。前記MPB64と稀釈液の混合比は稀釈液100部に対して、重量比で1乃至75部が好ましい。稀釈液100部に対して75部乃至50部として用いたが、前述の遅延型過敏反応が充分であれば、MPB64の混合比はもっと低くとも例えば50部乃至20部であっても、この発明の範囲である。更に試薬には人体に安全な非イオン界面活性剤、好ましくはツイーン80 (Polyoxyethylene sorbitan mono-oleate) が稀釈液に対して0.1乃至0.005%の割合で混合してある。ツイーン80の外、ツイーン60、ツイーン40、ツイーン20は勿論の事、他の非イオン界面活性剤であってもよい。これら試薬は50μl乃至200μl（マイクロリットル）とし、或いは4乃至5人分を一つのプラスチック容器か、ガラスアンプルに密封してあり、一回の検査で全量使い切る。これらの容器に封入する量は、単一人の検査用か、集団検査用かによって使い分ける。前述のMPB64は請求項1の発明においては一例であり、結核菌のみが産生する他の蛋白質と置き換えても請求項1記載の発明の実施の形態の一部である。

【0041】実施の形態2

前記請求項8、9のキット及び10乃至12の方法に用いられるパッチバンドとしては疎水性の粘着パッチバンドである。前記パッチバンドの中央部には直接または間接は7mm乃至15mmのガーゼなどの織布、不織布、綿布、合成樹脂製のスポンジなどよりなる親水性バットが付着させてある。好ましくは4枚折り程度のガーゼ、若しくは厚さ0.5乃至1.5mmの不織布がよい。前記パッチバンドは疎水性である事が好ましいが、疎水性でない場合は、親水性バットのパッチバンドとの接合部（境界部）が疎水性膜で覆われているものも、この発明のパッチバンドに含まれる。パッチバンドの一例としては、トリイ (Trolli) バンドが好ましいが、これに限定されるものではない。要は汗や、水に濡れても剥離せずパッチバンドの粘着剤でアレルギー反応を起こさないものであればよい。

【0042】実施の形態3

請求項10、11、12記載の検査方法の発明に関する実施の形態である。本件発明の試薬の対照として、通常市販のツベルクリン (PPD) を用いるが或いはB CG培養後の培地よりすべての蛋白をそのまま精製し、これを市販のツベルクリンと区別するためにPPD-eと命名したものを採用した。PPD-eも市販のツベルクリンも同様の反応を示すものである。その他B CG培養液培地より精製した活動性結核と反応としない他の蛋白質を用いることもできるが、実質上余り意味がない。

MPB 64 としては実施形態 1 のものを用い、パッチバンドとしては実施形態 2 のものを用いた。この発明において、上記態様に反しない限り、試薬は中の構成してある前記蛋白質の濃度の変更、パッチバンドの形態、濃度の変更、試験手順の変更があっても、これら発明の範囲に含まれる。

【0043】

【発明の効果】請求項 1、2 及び 7 記載の試薬並びに請求項 9 記載のキット中の試薬においては、前述の通りの構成であり、特に非イオン界面活性剤が、前述の通り混合しており、試薬の主成分たる蛋白質は活動性抗体と反応するものであり、特に MPB 64 は水溶性蛋白質であることと、相俟って効果的な材質となり、且つ全体が水溶性であるから皮膚から浸透し易く、テスト結果にバラツキが少なく、また接種体皮膚との親和性があり、試薬は皮膚から分泌された脂分等で解じられることなく密着し、試薬は能く電圧や汗液を透して体内に入る。このとき試薬の量はわずかであるが、パッチ内の試薬は 1 乃至 3 日の間は積極的にパッチから吸収されることにより少ない試薬でも充分な反応が得られ、特に、抗酸菌症のものと特異的の反応を認め、活動性抗体接種体を迅速に選別できる。特に BCG ワクチン接種後、活動性抗体となったものは従来のツベルクリンテストだけでは異なるツベルクリン陽性者と見分けができなかった者も、この試薬によるテストのみで簡単に区別することができる。

【0044】特に請求項 2 記載の発明においては蛋白質として MPB 64 を用いるから、人に接種を引起こす前記抗体は MPB 64 を産生するから、抗体に感染しているものは、本件試薬と密着して前記の反応を認め、これを検出する事が出来る。同様に牛型の抗体は M. bovis (M. bovis) により起り、牛型抗体であることも検出でき、接種体を牛にも適用し得る。またこれら試薬は請求項 10 記載の検査方法に使用でき、この方法は前記の試薬をパッチバンドに含ませて、単に貼り付けるだけの方法であるから、充分な医療設備のないところでも使用でき、また注射のように接種体、特に患者を傷つけることなく、子供にも恐怖を覚えずに実施可能となる。また、この検査乃至診断方法を実施する側のものは患者や自分自身を傷つける恐れのある道具例えば、メスや注射器を使用せず、感染のおそれのある患者の体液に触れる必要がないから、検査または診断結果を感染感染から遠ざける効果を有する。レントゲン検査や、その他の検査に比較して費用も特価に安くでき、特に幼稚園、小学校などの生徒、刑務所の囚人、ホームレス者などの集団の中から感染の危険性のある活動性抗体患者を迅速に選別でき、抗体の蔓延を阻止乃至抑制することに寄与するものである。

【0045】医師や看護士でなくとも、正確にさえ貼付すれば補助者でも貼付でき、後刻遅し、判定を受けるときにのみ医療機関に出頭すればよく、交通不便な土地

や、発展途上国において、極めて、利用価値の高いものである。また、この発明の試薬及び請求項 10 記載の検査方法は、一旦活動性抗体となった患者が、治療の結果、病気が治癒した場合は、この試薬によって陰性反応となるので治療効果を確認することができ、隔離病棟に入隔している患者の隔離の解放や、退院の時期の判定資料となし得る。

【0046】請求項 3、4、7 の試薬を用い、或いは請求項 7 のキットを用い、第 1 試薬と第 2 試薬を同時着しくは逐時的に行い請求項 11 記載の方法によって、その前記反応の陰陽の組み合わせにより、人型の抗体、牛型の抗体の区別がつく効果を実現する（表 1 参照）。請求項 9 記載の第 2 試薬の蛋白質としては必ずしも MPB 70 でなくとも牛型抗体のみが産生する蛋白質であれば他の蛋白質でもこの請求項 11 記載の発明の範囲である。請求項 5、6 及び 7 記載の発明の試薬を用い、或いは請求項 9 記載の試薬とパッチバンドよりなるキットを用い請求項 12 記載の方法の実施により、前記反応の陰陽の組み合わせにより、人型の抗体、牛型の抗体の区別がつく効果を実現する（表 1 参照）。併せて他の抗酸菌症からの区別がつく効果を実現する。前記請求項 9 記載の発明において、第 2 試薬の蛋白質は全ての抗酸菌が産生する蛋白質であれば MPB 59 でなくとも何でも同じである。第一陰陽で抗体陽性を検出し、そうでないものに従来のツベルクリン反応テストを行えばより安全である。ツベルクリンテストもパッチテストとすればより安全かつ簡便となる。

【0047】前述のパッチバンドを用いることにより、試薬は皮膚の所定位置にパッチバンドを外すまで固定され、また試薬には界面活性剤が少量含有されているから、皮膚との馴染みもよく、より少ない試薬であっても、前記パッチバンドを通しての外方への浸透は少なく充分に皮膚から浸透し、かつ 1 日乃至 3 日間積極的に浸透し所期の効果を実現する。また仮にツベルクリンテストを皮内注射する場合でも、先ずこの発明のパッチテストを行えば接種体の皮膚を注射器などで傷つける事になるが、これら接種体は活動性抗体ではないからこれらの接種体の体液と触れたり、体液を吸いまたはこれら接種に接する者が口で吸い込むことがあっても、感染のおそれはなく、従来の活動性抗体患者も必ずツベルクリンテストより遥かに安全である。

【0048】

【実施例】ステップ 1

活動性抗体の新しく、簡便、かつ早期診断方法の開発を目的に、試験対象者にパッチテスト法による MPB 64 抗原に対する皮膚反応試験を実施した。活動性抗体患者 53 人、PPD 陽性陽性者 43 人に対して、MPB 64 に対する反応が活動性抗体患者に対してのみ陰性かどうかを決定する試験が実施された。フィリッピンのマニラ近郊の 4 クリニック、アワ・レディ・オブ・グレイス区

(Our Lady Of Grace Parish)、セント・ニーニョ・デ・トンド区 (StoNino de Tondo Parish)、カノッサ・ヘルス・アンド・ソーシャル・センター (Canossa Health and Social Center)、ヘルス・ケア・デベロプメントセンター (Health Care Development Center)、からの結核患者にパッチテストが行われた。

【0049】活動性結核患者53人中52人がMPB54に対して陽性を示したが、PPD陽性健康人43人中1人も陽性を示さなかった。活動性結核に対するMPB54の感度は100%、特異度は99.1%、試験有効度は99.9%であった。MPB54を用いたパッチテストは、BCGワクチン接種対象者及び、結核に感染しているが発病していない対象者と活動性結核患者を区別する意味において、活動性結核の診断に有効で正確な方法であるといえる。この発見に関する実験の詳細はステップ2で述べる。

【0050】ステップ2

パッチテスト法を用いた活動性結核の診断に対する特異的抗原としてのMPB54の信頼性を評価するために、試験対象者を3つのカテゴリに分けてその比較試験を行った。

- (1) 活動性結核患者
- (2) ツベルクリン陽性の健康人
- (3) 家庭内結核感染者

ヒトにおけるMPB54の皮膚反応と臨床症状 (CLINICAL STATUS) の相関関係を調査した。なぜなら、この試験の目的は活動性結核に対する特異抗原としてのMPB54の信頼性を評価するものであり、活動性結核患者の選択が最も重要である。診療所に来る外来患者の診療記録を調べた。

【0051】これらの中で喀痰塗抹陽性であり、異常な胸部X線検査結果を示し、活動性結核の兆候を示す臨床症状を有する対象者はグループ1に分類される。培養結果はほとんどの場合において得られなかった。化学療法をはじめとする治療を受けていない患者に対してはMPB54の皮膚反応の効果はあきらかでない。しかしながら、6ヶ月間治療を受けた何人かの患者がグループ1にいる。かれらは最近の検査において陰性であったので、活動性結核患者とみなされている。

【0052】患者たちは診療所の近隣に暮らしていて、その社会経済環境は貧乏であった。試験判定をするために彼らに3日後に戻ってきてもらうためには、彼らの住まいの地理的位置は重要であった。試験した105人のうち試験判定に戻ってこなかったのはわずか12人であった。戻ってきた患者の中で53人が最終判定に有効であった。判定結果はステップ1に記載した。残りの対象者は除外された。彼らのパッチは判定時に移動してしまったり、剥がれ落ちてしまったりしたためである。

患者は診療記録によって群に分けられ、陰性陽性であり、異常な胸部X線検査結果を示し、結核を示唆する咳、熱、体重減少などの兆候を示す患者のみが活動性結核患者として選定された。培養陽性患者が望ましかったが、培養結果は後から7例しか有効ではなかった。活動性結核患者の大半は化学療法による治療を1から4ヶ月間受けている人たもであった。健康人は、試験開始時点で6ヶ月間の化学療法による治療中であった。ツベルクリン陽性の健康人のボランティアはフィリピン人や日本人であった。彼らは結核の兆候を示さなかった。試験の時点で、何家族かは結核患者と一緒に診療所を訪れていた。彼らは結核患者に接触した家族として試験をした。すべての試験対象者に試験のアウトラインを説明し、試験に対する同意を得た。3グループにおける試験対象者の内訳は以下のとおりである。

- グループ1：活動性結核患者53人
- グループ2：健康人 (コントロール) 43人
- グループ3：結核患者に接触した家族41人

【0053】MPB54はMボビスBCG東京株 (日本ビーシージー製造株式会社から供与) の8日固培養液から分離した。精製された蛋白質はPBSに溶解し、-20℃で保存した。蛋白質量はローリー法で測定した。その培養液を凍干沈殿したタンパクをツベルクリンPPDと区別するためにPPD-eTと命名し、パッチテストのコントロールとして用いた。結核菌青山B株から調製したPPDは日本ビーシージー製造株式会社から0.1mlの凍干成バッファーに懸濁したSTUのPPDを用いて皮内注射によるマントーテストを行った。

【0054】パッチテストの材料

直径15mmガーゼサイズのトリイパッチバンド (ガーゼが中心部に予めついているパッチバンド) を使用した。本件発明の試薬たる抗原溶液 (0.005% Tween 80を含む100µlのPBSにTween 80の抗原を含む) をガーゼに染み込ませパッチを対象者の前腕に貼付した。

【0055】パッチテストスケジュール

活動性結核患者とツベルクリン陽性健康人の右腕にMPB54パッチテストを、PPD-eTパッチテストを左腕に行った。それぞれのパッチは75µlの抗原を含んでいる。PPDは右の前腕パッチとは異なった場所に皮内注射した。PPD-eTパッチはタンパク抗原が皮膚を通して体内に入り込む事の確認のために用いた。もし、PPDテストが陽性でPPD-eTパッチテストが陰性であれば、皮膚を通しての検査は不完全であり、この場合は試験結果から除外した。貼付のパッチは3日 (72時間) 後に剥がし、反応を陽性が陰性が判定した。皮膚の部位に何も変化がなければ陰性、抗原に反応して発赤、発熱、赤い小斑点が部位に認められた場合は陽性である。前腕と上腕でパッチを貼付し比較した。パッチは判定時に、前腕 (17.6%) よりも上腕 (4

1. 2%)の方がより判がれ易かった。よって、成人に対して行う試験は前院がよい。

【0055】統計値

ヒトにおけるMPB64パッチテストの結果を評価するために2×2の分割表で分析を行った。

活動性結核患者とツベルクリン陽性健康者

表2はグループ1と2におけるMPB64に対する陽性と陰性の陽性の人数を示した。全ての対象者においてPPDマントーテストとPPD-RTパッチテスト陽性で

グループ	陽性	陰性	合計
1. 活動性結核患者	12	10	22
2. ツベルクリン陽性健康者	2	10	12
合計	14	20	34

【0058】結核患者に接触した家族グループ3の結核患者に接触した家族は41人でそのうち男性12人、女性29人であった。パッチテストの結果を表3に示した。対象者のうち25人が、PPD-RTパッチテスト、MPB64パッチテストに対して陽性であった(03.4%)。そして対象者の9人はPPD-RT陽性であったが、MPB64パッチテストに対して陰性であった(22.0%)。5人はPPD-RTパッチテスト、MPB64パッチテストに対して陰性であった。これら

グループ	陽性	陰性	合計
1. 活動性結核患者	12	10	22
2. ツベルクリン陽性健康者	2	10	12
合計	14	20	34

【0060】この検査からMPB64パッチテストが活動性結核の早期診断の有望なツールになることが強く示唆された。MPB64パッチテストは結核患者とBCGワクチンを接種したヒト、あるいは結核感染を起こしているが発症していないヒトを、感度：98.1%、特異性：100%で区別することができる。パッチテストはまた経済的簡便さにおいて皮内注射より優れ、その実用性において安全である。議論付けはされていないが、パッチテストでは患者に対する反応のための抗原を連続的に供給することができると考えられている。

【0061】症例1

皮膚へのパッチ法を用いた活動性結核に対する特異的診断抗原としての症例性を決めるために、モルモットを用いた比較試験を行った。試験開始時に300-400gのモルモット(Femle albino Hartley)を東京の日本医科学動物実験研究所から購入した。モルモットは日本ビーシーエー製造株式会社においてSPF環境下

であった。これらの結果から以下の数値が計算される。感度：98.1%、特異性：100%、陰陽性度：0%、陽性反応率：1.9%、陽性反応率中位：100%、陽性反応率中位：97.7%、試験有効度：98.9%。これらの結果は、MPB64パッチテストが活動性結核とツベルクリン陽性健康者を区別するのに有効な方法であることを示唆するものである。

【0057】

【表2】グループ1とグループ2の2×2分割試験

両パッチテスト陽性の対象者はPPDマントーテストに対しても陽性であった。グループ3の対象者は陰陽性において結核患者として登録されていなかった。それぞれのヒトは結核を示唆するいくつかの徴候が観察されたにもかかわらず、臨床上の症状は解らなかった。

【0059】

【表3】家族に活動性結核患者がいる人々のMPB64とPPD-RTパッチテスト

で飼育管理した。

抗原

抗原は前記ステップ2で設定した方法と材料に従って調製した。

モルモットの免疫法

BCG生菌ワクチン(日本ビーシーエー製造株式会社)を取扱説明書に従って再調製し、モルモット1匹あたり0.5mlを、アジュバントなしで皮下注射した。モルモットはBCG注射後、4-2週間後に試験した。

パッチテストの材料

直径7mmガーゼサイズのトリイパッチバンドを使用した。抗原溶液(0.005%ツインB0を含む150LのPBSに75μlの抗原を含む)をガーゼにしみ込ませそれぞれのモルモットの体毛を剃った部位に貼付した。MPB64を表4に示したように様々な濃度でパッチにし、そのパッチバンドを、BCGで免疫した

モルモットの左右の鼠毛を脱毛し貼付した。

【0052】

MPB54 (mg/パッチ)	4時間後	対 照
31, 2		
14, 4		
7, 5	--	--
4, 7		
2, 9		

【0053】パッチテストスケジュール

パッチは24時間後にはがし、直ちに反応を観察した。局所の皮膚に何も変化がない場合は陰性、抗原に反応して発赤、発腫、赤い小斑点が局所に認められた場合には陽性として記録した。

BCGで免疫したモルモットにおけるパッチテストのMPB54のドーズレスポンス（容量依存）

予め4週間BCG東京株によって免疫されたモルモットを、抗原の様々な量によるMPB54パッチテストに使用した。パッチテストの最高投与量は75μg/パッチであった。モルモットはMPB54を2、3から75μg/パッチまで徐々に含んだパッチで試験した。パッチを24時間後にはがし、反応が陽性か陰性が判定した。モルモットがBCGで感作されていることを確かめるため、パッファーO、1mlに溶かしたPPDO、0.5μgを皮内に注射し、皮膚反応を24時間後に観察した。表4に容量依存試験の結果を示した。MPB54の反応は4、75μg/パッチあるいはそれより高い量で陽性であった。2、3μg/パッチにおいては陽性反応は観察されなかった。PBSだけを含む陰性コントロールのパッチではBCGで免疫したモルモットに対して何の皮膚反応も引き起こさなかった。何も免疫されていないモルモットはPPDOやMPB54に対して何の反応も示さなかった。

【0054】BCG免疫モルモットのMPB54に対する皮膚反応の時間経過

BCG免疫モルモットのMPB54を皮内注射によって試験した場合、BCG免疫後15週するとMPB54に対する皮膚反応が消失する事が知られている。このことが事実かどうかを確認するために、モルモットをBCGで免疫し、BCG注射後さまざまな時間に於いて、MPB54パッチで試験を行った。個々のモルモットはブラスター効果を避けるために一回の使用とした。コントロールとして、PPDO-eTパッチテストを同時に各々のモルモットに対して行った。結果は図1に示した。遅延型過敏（DTH）反応は3+、2+のように表示した。なぜなら反応の強度は抗原量によってではなく、パッチのサイズによって規定されるからである。MPB54パッチテストの皮膚反応は、BCG注射後13週まではすべ

【表4】モルモットパッチテストの容量依存反応

てのモルモットに対して陽性であった。それ以後は、検出閾値となった。そして23週目に完全に反応は陰性となった。これとは対称的に、PPDO-eTパッチテストに関する反応は、BCG注射後23週の最終時点まで陽性であった。MPB54やPPDO-eTに関する遅延型過敏（DTH）反応はBCG注射後さまざまな時間において試験された。図1のそれぞれの点は、3匹のモルモットの遅延型過敏反応を表している。

3+：発赤、硬結

2+：硬結

1+：小斑点

0：反応なし

モルモットにおけるパッチテストではヒトで用いられた抗原量の1/15でも陽性を検出することが確認された。

【0055】前記の反応において、活動性結核に感染した動物、またはBCG接種した場合これらが体内で増殖している限りにおいて、MPB54は分泌され、これに対応する免疫細胞たるT-細胞の活動が活発になる。従って、その後外部から、MPB54が注入されると、前記T-細胞が反応し、遅延型過敏反応を起こすと考えられている。よって、BCG接種後しばらくするとBCGの活動は停止し、前記免疫細胞も活動を停止、その後MPB54の侵入には何の反応も起こさない。同様に活動性結核菌も活動を停止乃至死滅すればMPB54を分泌せずMPB54との遅延型過敏反応は起こさないことになる。つまり、細胞の細胞性免疫反応を利用したものである。

【0056】この反応のメカニズムはまず抗原が抗原提示細胞によって感作T細胞に示され感作T細胞から放出したサイトカインが次の細胞群を活性化し、更にその細胞から出る前記のサイトカインが、また別の細胞群を活性化し、と言う有秩序のもの細胞性の反応が開始し、実際の局所反応が見られるまでに時間がかかると推測される。遅延型過敏反応ではまずT細胞からIL-2（インターロイキン-2）が出て、これより単球や、内皮細胞のIL-1、TNF-αの産生が促進すると考えられる。

【0057】IL-1はマクロファージから出るが、同

時にマクロファージを活性化し、 $IL-8$ や $IL-12$ などのサイトカインを出させる。 $IL-8$ は好中球を誘引し、 $IL-12$ はT細胞やNK細胞やマクロファージを活性化する。更にGM-CSF、 $IL-6$ などが他の細胞を活性化し、局所へと誘引する働きをする。

【0066】反応時間と共に局所への細胞の集合が増え、この反応を止めるものと推測される。この反応は通常72時間から96時間まで続き、その後は抗原が局所から消失するため反応は休息し、皮膚は元の状態に戻る。

る。反応の休息にはTGF- β の関与もあるものと考えられる。従って活動性結核に感染している者はこの結核菌が活動している限り、MPB84を産生し続けるから、MPB84を含む試験に対し、反応する事になる。

【図面の簡単な説明】

【図1】BCGを接種したモルモットのPPD- α TとMPB84に対する遅延型過敏反応の時間経過との関係を示すグラフである。

【図1】

